

Originalarbeiten

Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen an Trockenfrüchten

Zusammenhang von Kohlenhydratzusammensetzung und ESR-Signal-Struktur der bestrahlten Früchte

J. Mischke, N. Helle, B. Linke, G.A. Schreiber und K.W. Bögl

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Fachgebiet Lebensmittelbestrahlung, Berlin

Electron spin resonance measurements on dried fruits Sugar composition and ESR signal structure of irradiated fruits

Zusammenfassung: Nachdem in einer früheren Arbeit der ESR-spektroskopische Nachweis von strahlenbehandelten Trockenfrüchten besprochen wurde, wird in diesem Bericht die flüssigchromatographische Bestimmung der Kohlenhydratfraktion dieser Früchte vorgestellt und ein Zusammenhang zwischen der Zuckerzusammensetzung und den ESR-Signalstrukturen nachgewiesen.

Die bei der Bestrahlung von Trockenfrüchten beobachteten ESR-Spektren lassen sich in 3 Typen unterteilen. Die Zuordnung der Trockenfrüchte zu den einzelnen Typen anhand ihrer Kohlenhydratzusammensetzung gelingt in einer überwiegenden Zahl der untersuchten Proben. Weiterhin wird festgestellt, daß die beobachteten ESR-Signale in ihrem Habitus denen der reinen bestrahlten Mono- und Disaccharide ähnlich sind. Dies trifft besonders für saccharosereiche Früchte und Saccharose zu.

Die Struktur der ESR-Spektren strahlenbehandelter Trockenfrüchte kann sich über einen längeren Zeitraum ändern. Für die Veränderung werden radikalische Umwandlungen in der Probenmatrix verantwortlich gemacht.

Summary: While in a previous work the ESR spectroscopic detection of irradiated dried fruits was reported, in this paper liquid chromatographic determination of the carbohydrate fraction of these fruits is introduced and connected with the ESR results.

After irradiation of dried fruits three different types of ESR spectra are observed. In most cases the dried fruits can be attached to these various types by means of their sugar composition. It was also found that the ESR spectra observed for sucrose-rich fruits are very similar to that of pure sucrose.

The structure of the ESR spectra can change with storage. Probably, radical rearrangement reactions in the samples are responsible for these changes.

Schlüsselwörter: ESR – HPLC – Lebensmittelbestrahlung – Trockenfrüchte – Kohlenhydrate

Key words: ESR – HPLC – food irradiation – dried fruits – sugars

Abkürzungen:

ESR: Elektronen-Spin-Resonanz
kGy: Kilogray
TMS: Trimethylsilyl

HPLC: Hochdruckflüssigkeitschromatographie
RI: Brechungsindex (refractive index)
ENDOR: Electron nuclear double resonance

Einleitung

In den vergangenen Jahren sind auf dem Gebiete des Bestrahlungsnachweises verschiedene chemische und physikalische Methoden entwickelt worden. Eines dieser Verfahren ist die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR), mit deren Hilfe der Nachweis strahlenspezifisch gebildeter Radikale im Lebensmittel gelingt. Prinzipiell ist die ESR-Messung an allen wasserarmen Lebensmittelbestandteilen (Knochen, Gräten, Schalen u.a.) möglich, da in ihnen die Radikale über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden können (1).

In einer früheren Arbeit haben wir ESR-spektroskopische Untersuchungen an verschiedenen Trockenfrüchten vorgestellt (2). Es wurden charakteristische Spektren beschrieben, die möglicherweise als Bestrahlungsnachweis herangezogen werden können, sich jedoch bei den einzelnen Früchten unterscheiden. Um die Eignung dieser Methode zum Nachweis einer erfolgten Bestrahlung an Trockenfrüchten zu testen, wurde vor einiger Zeit auf europäischer Ebene ein Ringversuch an bestrahlten getrockneten Papayas und Rosinen durchgeführt (3, 4). Die erzielten Ergebnisse waren vielversprechend, sowohl die Rosinen als auch die Papayas konnten in den meisten Fällen richtig identifiziert werden. Fehlidentifizierungen traten lediglich bei wenigen mit 0,5 kGy bestrahlten und unbestrahlten Proben auf. Obwohl die Tatsache, daß Trockenfrüchte charakteristische ESR-Spektren geben, bekannt ist, gibt es noch kaum Kenntnisse darüber, welche Radikale für die Signale verantwortlich sind, wie sich diese Radikale unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei längerer Lagerung verhalten und wie die resultierenden ESR-Spektren aussehen. In der vorliegenden Arbeit sollen Untersuchungen zur Aufklärung dieser Fragen vorgestellt werden.

Früchte haben im allgemeinen Trockenmassen von 10–20 %. Den größten Anteil stellen dabei Kohlenhydrate (5–18 %), während organische Säuren (0,2–0,5 %, in Einzelfällen bis zu 3,2 %), Stickstoffverbindungen (0,1–1,5 %) und Lipide (0,1–0,5 %) nur in geringen Mengen enthalten sind. Der Kohlenhydratanteil setzt sich (bis auf wenige Ausnahmen) fast ausschließlich aus den Monosacchariden D-Glucose und D-Fructose sowie dem Disaccharid Saccharose zusammen. Verschiedene Kern- und Steinobstsorten können zusätzlich noch größere Mengen des Zuckeralkohols D-Sorbit (D-Glucitol) enthalten. Das Verhältnis der Zuckerarten zueinander variiert in den einzelnen Fruchtsorten.

Bei der Trocknung reichern sich die Inhaltsstoffe von Früchten in hohem Maße an. Getrocknete Früchte enthalten üblicherweise 15–25 % Wasser, 60–75 % Kohlenhydrate, 1,5–5,0 % Stickstoffverbindungen und 0,4–1,5 % Lipide. Die Kohlenhydrate sind damit der Hauptbestandteil im Trockenobst. Ihr Einfluß auf die ESR-Spektren von bestrahlten Proben stand deshalb im Vordergrund unserer Untersuchungen.

Versuchsbeschreibung

γ -Bestrahlung

Die Bestrahlung der Trockenfrüchte erfolgte im Hahn-Meitner-Institut Berlin mit einer Co-60-Strahlenquelle. Die Proben wurden in definierten Entferungen vom Cobalt-Stab positioniert. (Die Positionen werden regelmäßig mittels Fricke-Dosimetrerie überprüft). Die Früchte wurden in schmalen Schraubdeckelgläsern (Durchmesser max. 4 cm) mit Dosen zwischen 0,5 und 3,0 kGy bei Raumtemperatur bestrahlt, die Dosisleistung betrug etwa 15 Gy/min.

Probenvorbereitung für die HPLC

Die Zuckerbestimmung erfolgte vorwiegend an unbestrahlten Früchten.

Die Früchte wurden kleingeschnitten, in flüssigem Stickstoff eingefroren und innerhalb von ca. 30 s in einer Kaffeemühle fein zermahlen. 2 g dieser Probe konnten dann in ca. 50 ml 80 %igem Ethanol aufgeschlämmt und 1 min mit einem Ultra-turrax intensiv vermischt werden. Die Lösung wurde abfiltriert, der Filterkuchen mehrmals mit 80 %igem Ethanol nachgewaschen und der Gesamtextrakt mit 80 %igem Ethanol auf 100 ml aufgefüllt. 10 ml dieser Lösung wurden am Rotationsverdampfer auf etwa 1 ml eingeengt und mit bidest. Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Nach dem Filtrieren durch ein 0,22 µm-Membranfilter war die Lösung zur Injektion in die HPLC bereit.

An allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

HPLC-Messungen

System:	HPLC-Pumpe LC-6A SHIMADZU Injektionsventil RHEODYNE Differential-Refraktometer KNAUER Chiralyser IBZ MESSTECHNIK
Säule:	EuroKat Pb 300 x 4 mm KNAUER oder EuroKat Ca 300 x 4 mm KNAUER (Kationenaustauscher auf Styrol-Divinylbenzol-Basis, mit Pb^{2+} - bzw. Ca^{2+} -Ionen belegt) Säulentemperatur 70 °C
Eluent:	HPLC-reines Wasser (MERCK) 0,2–0,3 ml/min

Probenvorbereitung für die ESR

Es wurden Probenmengen von ca. 50 mg der zu untersuchenden Trockenfrüchte verwendet. Diese Menge ist für den Nachweis einer Strahlenbehandlung bis hinab zu 0,5 kGy ausreichend. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit können die Proben vor der Messung 2 Stunden bei 60 °C im Vakuum getrocknet werden. Der Trocknungsprozeß beeinträchtigt die ESR-Signalintensität nicht. Von diesen so getrockneten Proben können größere Mengen für die ESR-Messung eingewogen werden.

ESR-Meßbedingungen

BRUKER ESP300E-Spektrometer, TMH-Rechteck-Cavity
Magnetfeld: 348,5 mT Zentrum, 20 mT Sweepweite
Mikrowelle: 9,79 GHz, 4,0 mW Leistung
Verstärker: 100 kHz Modulation; 0,32 mT Modulationsamplitude; $5,0 * 10^4 - 5,0 * 10^5$ Verstärkung
Meßtemperatur: Raumtemperatur
Meßgefäß: Suprasil-Quarzküvetten, Durchmesser (außen) 5,0 bzw. 6,0 mm, Länge 150 mm

Ergebnisse

ESR-Spektren und Zuckerzusammensetzung

Es wurden Messungen an 13 verschiedenen Fruchtsorten durchgeführt. Die unbestrahlten sowie die mit 0,5, 1,5 und 3,0 kGy bestrahlten Proben der Trockenfrüchte wurden mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Zu Vergleichszwecken wurden auch einige natürlich vorkommende Mono- und Disaccharide (z.B. D-Glucose, D-Fructose und Saccharose) mit einer Dosis von 3,0 kGy bestrahlt und bei den gleichen Meßbedingungen untersucht.

In allen Fällen zeigen die unbestrahlten Proben sowohl der Trockenfrüchte als auch der Mono- und Disaccharide selbst bei hoher Verstärkung kein ESR-Signal (vgl. Abbildung 1). Demgegenüber geben schon mit geringen Dosen (500 Gy) bestrahlte Proben sehr deutliche Signale, wodurch ein sehr empfindlicher Nachweis einer Strahlenbehandlung von Trockenfrüchten möglich ist.

Da die Trockenfrüchte bis zu 75 % niedermolekulare Kohlenhydrate enthalten, ist es zu erwarten, daß die bei der Bestrahlung aus den Mono- und Disacchariden entstehenden Radikale für die ESR-Signale verantwortlich sind. Ein Vergleich der Spektren bestrahlter Saccharide und Trockenfrüchte zeigt deutlich Ähnlichkeiten in der Struktur der Spektren, in einigen Fällen sogar Identität (2).

Die Spektren der bestrahlten Trockenfrüchte lassen sich in drei Typen unterteilen. Beispiele für die ESR-Signale einiger Trockenfrüchte sind der Abbildung 1 zu entnehmen. Dem Typ A lassen sich die ESR-Spektren von Ananas, Jackfrucht und Zwergorange zuordnen. Charakteristisch ist die sehr große Ähnlichkeit dieses Typs sowohl in der Struktur als auch in der Gesamtaufspaltung (ca. 7,8 mT) zu dem Spektrum der reinen bestrahlten Saccharose. Der Typ B wurde bis jetzt nur bei einigen Korinthenorten beobachtet. Er zeigt ebenfalls Ähnlichkeiten zum Spektrum der reinen Saccharose und besitzt eine Gesamtaufspaltung von 7,5 mT. Rosinen, Feigen, Sultaninen, Mangos und eine Korinthenart gaben ESR-Signale vom Typ C. Dieser Typ lässt sich mit keinem einzelnen Mono- oder Disaccharid vergleichen und besitzt mit 10,0 mT die größte Gesamtaufspaltung. Die Struktur unterscheidet sich stark von der der anderen Spektrrentypen.

Die Zuckerzusammensetzungen der untersuchten Trockenfrüchte sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle Trockenfrüchte enthalten 60–78 % Kohlenhydrate in Form von Mono- und Disacchariden. Mit der verwendeten HPLC-Methode wurden keine signifikanten Unterschiede in den Mono- und Disaccharidgehalten unbestrahlter und bestrahlter Proben festgestellt. Nach der Zusammensetzung der Mono- und Disaccharide lassen sich die Früchte in zwei Hauptgruppen zusammenfassen:

1. Saccharosereiche Fruchtarten
2. Glucose- und fructosereiche Fruchtarten.

Die Chromatogramme einer Aprikosenprobe mit RI- und Chiraldetektion sind in Abbildung 2 dargestellt.

Der Tabelle 1 ist zusätzlich die Zuordnung der untersuchten Früchte zu den einzelnen Spektrrentypen zu entnehmen. Bei den meisten Proben ist eine Übereinstimmung von Kohlenhydratmuster und Spektrrentyp zu erkennen.

Von einigen Trockenfrüchten (Kiwi, Sternfrucht, Sauerkirsche) ließen sich keine ESR-Spektren aufnehmen. Ein Vergleich der Kohlenhydratzusammensetzung dieser Früchte mit der der „ESR-fähigen“ Trockenfrüchte zeigt keine grundlegenden Abweichungen.

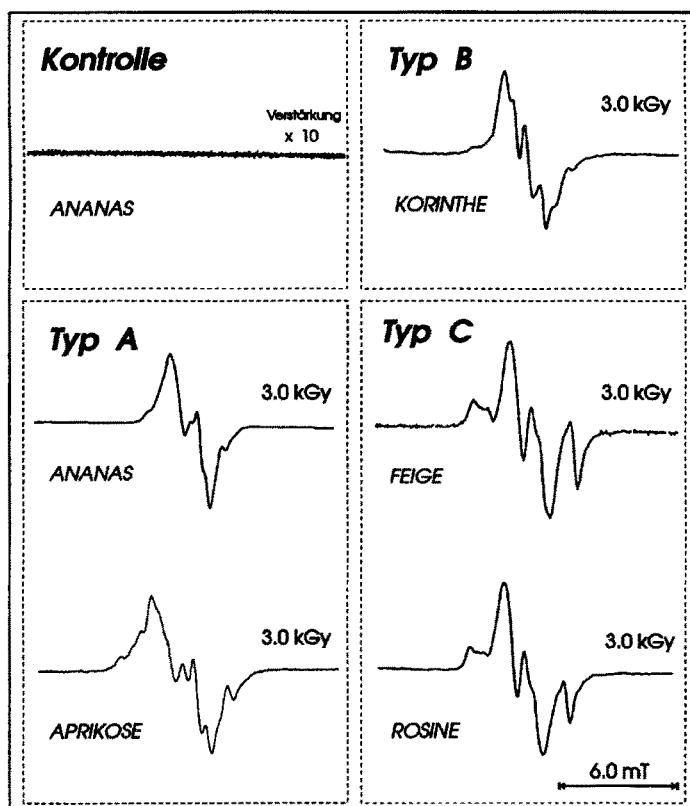


Abb. 1. ESR-Spektren verschiedener γ -bestrahlter Trockenfrüchte.

Es wurden Versuche unternommen, die Spektren einzelner typischer Trockenfrüchte zu simulieren. Dazu wurden Mono- und Disaccharide entsprechend der Zusammensetzung in den Trockenfrüchten in kristalliner Form gemischt, anschließend bestrahlt und ESR-spektroskopisch vermessen. Die Untersuchungen erbrachten Spektren, die denen der Früchte grundsätzlich ähneln, jedoch nicht mit dem Spektrum der jeweiligen Trockenfrüchte identisch sind.

Lagerungsversuche

Zur Einschätzung der Stabilität der beobachteten ESR-Signale wurden Lagerungsversuche (bei Raumtemperatur) durchgeführt. In der Regel wurde bei mehrmonatiger Lagerung bei Raumtemperatur keine Änderung der Spektrenstruktur sondern lediglich eine geringfügige Abnahme der Signalintensität beobachtet. Jedoch konnten auch bei mit niedrigen Dosen bestrahlten Trockenfrüchten noch mehrere Monate nach der Bestrahlung eindeutig Radikale nachgewiesen werden. Bei einigen Proben zeigte sich jedoch, daß sich die Struktur der Spektren änderte. Abbildung 3 zeigt die ESR-Spektren einer Rosinenprobe 1 Tag bzw. 3 Monate nach der Bestrahlung mit 3 kGy. Sofort nach der Bestrahlung wird ein Spektrum gemäß Typ C beobachtet. Das 3 Monate später aufgenommene Spektrum weist einen veränderten Habitus auf und nähert sich dem Typ A an. Ein ganz ähnliches Spektrum wie hier nach

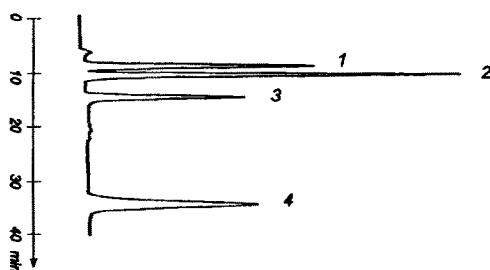
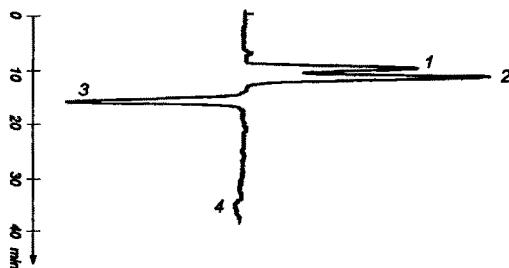
a) RI-Detektion**b) Chiralldetektion**

Abb. 2. Chromatogramme einer Aprikosenprobe mit RI- und Chiralldetektion
(1 = Saccharose, 2 = D-Glucose,
3 = D-Fructose, 4 = D-Sorbit)
Trennung auf EuroKat Pb, Eluent Wasser
0,2 ml/min, 70 °C

Tab. 1. Zusammensetzung der Kohlenhydratfraktion der Trockenfrüchte und ihre Zuordnung zu den ESR-Spektrentypen

Frucht	Gesamtzucker-gehalt ^a (g/100g Frucht)	Saccharose ^b (%)	Glucose ^b (%)	Fructose ^b (%)	Sorbit ^b (%)	Spekrentyp
Ananas	77,3	63,5	19,5	17,0	n.n.	A
Jackfrucht	72,2	57,6	22,0	20,4	n.n.	A
Zwergorange	77,8	69,0	16,8	14,2	n.n.	A
Aprikose	54,1	25,5	28,9	20,0	25,6	A
Sultanine	70,5	2,0	48,7	49,3	n.n.	C
Feige	60,7	5,5	46,5	47,7	0,3	C
Korinthe	68,9	3,7	46,9	49,2	0,2	B,C
Rosine	70,4	4,5	46,5	48,7	0,3	C
Kiwi	70,5	11,3	47,2	41,5	n.n.	kein Spektrum
Sternfrucht	74,3	3,7	51,5	44,8	n.n.	kein Spektrum
Papaya	70,1	18,7	43,2	38,1	n.n.	?
Mango	70,8	21,9	41,2	36,9	n.n.	C
Sauerkirsche	57,5	2,7	46,6	32,5	18,2	kein Spektrum

^a Mono- und Disaccharide

^b bezogen auf 100 % Gesamtzuckergehalt

n.n. = nicht nachweisbar

1 Tag nach Bestrahlung



3 Monate nach Bestrahlung



Abb. 3. ESR-Spektren einer mit 3,0 kGy bestrahlten Rosinenprobe.

3 Monaten Lagerung konnte bei Sultaninenproben beobachtet werden, die 1988 bestrahlt und 1991 gemessen worden waren, die also zur Zeit der Messung 3 Jahre alt waren.

Diskussion

Bei der überwiegenden Zahl der untersuchten Proben läßt sich eine direkte Verbindung zwischen der Saccharidzusammensetzung und dem ESR-Spektrum nachweisen. Die Spektren können drei grundlegenden Typen (Typ A, B und C) zugeordnet werden, die sich in den charakteristischen ESR-Größen Spektrenstruktur und Gesamtaufspaltung unterscheiden. Früchte mit ähnlichen Kohlenhydratmustern finden sich unter den gleichen Spektrrentypen. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß die Trockenfrüchte bis zu 75 % Kohlenhydrate in Form von Mono- und Disacchariden enthalten, lassen darauf schließen, daß bei der Bestrahlung entstehende stabile Zuckerradikale die Verursacher der ESR-Signale sind. Dies wird auch aus dem Vergleich mit den bestrahlten reinen Mono- bzw. Disacchariden (insbesondere der Saccharose) deutlich, die ebenfalls stabile Radikale mit z.T. sehr ähnlicher Struktur ergeben.

Zum Typ A gehören erwartungsgemäß Trockenfrüchte, die einen sehr hohen Saccharoseanteil (über 57 % aller Mono- und Disaccharide) gegenüber geringeren D-Glucose- und D-Fructose-Gehalten (meist unter je 20 %) aufweisen. Allerdings

geben auch bestrahlte Aprikosen ein dem Typ A ähnliches Spektrum, obwohl sich die Kohlenhydratzusammensetzung neben Saccharose etwa gleiche Mengen an Fructose und Glucose enthält. Wahrscheinlich dominieren hier die in der Saccharose gebildeten Radikale das Gesamtspektrum.

Die glucose- und fructosereichen Trockenfrüchte lassen sich fast alle dem Spektrentyp C zuordnen. Sie enthalten über 40 % D-Glucose und D-Fructose neben weniger als 6 % Saccharose in der Kohlenhydratfraktion. Auch bestrahlte Mangos, deren Kohlenhydratfraktion neben viel D-Glucose und D-Fructose noch fast 22 % Saccharose aufweist, ergeben ein ESR-Spektrum, das dem Typ C entspricht. Offensichtlich überwiegen hier die aus D-Glucose und D-Fructose entstehenden Radikale auch bei höheren Saccharoseanteilen.

Möglicherweise wird in der von der HPLC erfaßten Gesamtzuckerzusammensetzung nicht die tatsächliche Zusammensetzung der für die stabilen Radikale verantwortlichen Mikrokristallite wiedergegeben.

Für die Annahme, daß für die beobachteten ESR-Signale spezielle kristalline Bereiche verantwortlich sind, spricht auch, daß in einigen getrockneten Früchten (z.B. Kiwi- und Sternfrucht) nach der Bestrahlung keine Radikale nachweisbar waren, obwohl sie nach ihrer Zusammensetzung zu den glucose- und fructosereichen Sorten gehören. Für diese Früchte wäre ein Spektrum entsprechend Typ C zu erwarten. Ursachen für das Fehlen mikrokristalliner Bereiche könnten Unterschiede in der Zellstruktur der Früchte oder in dem verwendeten Trocknungsverfahren sowie im Restwassergehalt sein.

Es ist bislang nicht gelungen, die ESR-Spektren von bestrahlten Trockenfrüchten des Typs B und C anhand ihres Kohlenhydratmusters zu simulieren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, daß durch die Bestrahlung nicht nur Primärradikale entstehen, sondern daß auch Folgereaktionen in der Probenmatrix ausgelöst werden.

Die Änderung der Struktur des ESR-Spektrums bestrahlter Rosinen während der Lagerung weist auf Reaktionen der Radikale in der Probenmatrix hin. Offensichtlich laufen diese Reaktionen sehr langsam ab und führen zu stabileren Radikalen. Denkbar ist auch das Verschwinden einer Komponente aus einem Radikalgemisch, so daß ein oder mehrere stabilere Radikale übrigbleiben. Beim Radikaltyp A sind keine Veränderungen des Spektrums während der Lagerung beobachtet worden, er wird offenbar von sehr stabilen Radikalformen hervorgerufen.

Um genauere Informationen über diese Folgeprozesse zu erhalten, wird es notwendig sein, die einzelnen Radikaltypen zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollen im weiteren Verlauf unserer Arbeiten Versuche mit Nitroxiden durchgeführt werden (5, 6), die mit den einzelnen Zuckerradikalen zu so stabilen Radikalen abreagieren, daß diese unzerstört in Lösung gebracht werden und voneinander getrennt werden können. Die Struktur dieser Nitroxid-Radikale kann dann mittels ESR- und ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance)-Spektroskopie untersucht werden.

Literatur

1. Helle N, Linke B, Mager M, Schreiber G, Bögl KW (1992) Stand der Entwicklung der Elektronen-Spin-Resonanz zum Nachweis bestrahlter Lebensmittel. Z Ernährungswiss 31:205
2. Helle N, Linke B, Schreiber GA, Bögl KW (1992) Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen an zuckerhaltigen Lebensmitteln; Nachweis der γ -Bestrahlung von Trockenfrüchten. Bundesgesundhbl 35:179

3. Raffi J, Stevenson MH, Kent M, Thiery JM, Belliardo J-J (1992) European intercomparison on electron spin resonance identification of irradiated foodstuffs. *Int J Food Sci Technol* 27:111
4. Raffi J (1992) Electron spin resonance intercomparison studies on irradiated foodstuffs. BCR information. EUR/13630/EN (Commission of the European Communities, Brussels, Luxembourg)
5. Agnel J-P, Thiery C, Battesti C, Vincent P, Raffi J (1985) High performance liquid chromatography and electron spin resonance studies of some sugar-nitroxide solutions. *Anal Letters* 18:1013
6. Triolet J, Thiery C, Agnel J-P, Battesti C, Raffi J, Vincent P (1990) ESR spin trapping of gamma induced radicals in sucrose. *Free Radical Res Comm* 10:57

Eingegangen 23. Juli 1993
akzeptiert 11. August 1994

Für die Verfasser:

J. Mischke, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Fachgebiet Lebensmittelbestrahlung, Postfach 33 00 13, 14191 Berlin